

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پیراپزشکی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

بررسی ارتباط بین الگوی متیلاسیون پروموتور ژن آنزیم DNMT1 با بیان ژن Ecad در  
بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد تایپ M3

اساتید راهنما:

دکتر مهدی سهمانی

دکتر مهدی آزاد

استاد مشاور:

دکتر فرشاد فروغی

نگارنده:

ساناز زبردست

تابستان ۹۷

## چکیده

**هدف:** لوسمی پرومیلوسیتیک حاد یکی از زیرگونه های لوسمی میلوئید حاد است که در آن یک رونوشت نوترکیب تاثیر منفی روی تمایز سلول های پیش ساز میلوئیدی میگذارد و بلوغ آن ها در مرحله ی پرومیلوسیتیک باقی میماند. متیلاسیون یک مکانیسم اپی ژنتیکی است که اغلب عملکرد ژن ها را تغییر داده و بیان ژن ها را تحت تاثیر قرار میدهد که گاهی اوقات منجر به پیشرفت سرطان میشود. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که متیلاسیون DNA میتواند پیامد های بالینی در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد را پیش بینی نماید و متیلاسیون نا به جا میتواند به عنوان بیومارکر برای پیش بینی ریسک بیماری تلقی گردد. نقش بسیار واضح متیلاسیون DNMT1 در پاتوژنز انواع سرطان ها و اهمیت DNMT1 در کنترل متیلاسیون، ما را بر آن داشت مطالعه ای در این زمینه انجام دهیم. فاکتور Ecad از عوامل سرکوبگر تومور بوده و نقش مهمی در کنترل میزان تکثیر سلولهای پستانداران بر عهده دارد. از طرفی از عوامل تنظیم کننده بیان ژن فوق ، متیلاسیون پروموتور آن میباشد و این متیلاسیون توسط عواملی نظیر DNMT1 انجام میگردد. بنابراین تعیین ارتباط متیلاسیون پروموتور ژن DNMT1 با بیان ژن Ecad در لوسمی میلوئید حاد M3، میتواند گام موثری در پایه ریزی مطالعات هدفمند جهت تولید دارو های جدید برای درمان این بیماری باشد.

**روش بررسی:** DNA از سلول های سفید خونی پانزده بیمار و پنج کنترل استخراج شد سپس با بی سولفیت تیمار شد و متعاقب آن الگوی متیلاسیون ژن به کمک روش MSP مورد بررسی قرار گرفت. همچنین جهت بررسی اینکه آیا ارتباطی میان الگوی متیلاسیون پروموتور ژن DNMT1 با بیان ژن Ecad وجود دارد از Real-Time PCR برای اندازه گیری سطوح بیان ژن استفاده گردید.

**یافته ها:** به کمک تکنیک MSP این نتایج حاصل شد که پروموتور ژن DNMT1 در همه ی نمونه ها غیر متیله میباشد. همچنین بیان ژن Ecad در نمونه های بیمار ۳/۱ برابر نمونه های سالم بود.

**بحث و نتیجه گیری:** از آنجا که پروموتور ژن DNMT1 غیر متیله بوده و بیان آن در نمونه های بیمار افزایش داشت به نظر میرسد که استفاده از مکانیسم های اپی ژنتیکی برای کاهش بیان این ژن در درمان لوسمی کمک کننده است. با این حال تکنیک MSP تغییرات کوچک در سطوح متیلاسیون را مشخص نمی کند. همچنین با آنالیز بیان ژن Ecad این نتیجه حاصل شد که ارتباط مشخصی بین متیلاسیون پروموتور ژن Ecad با بیان ژن DNMT1 وجود ندارد.

**کلید واژه ها:** لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، متیلاسیون پروموتور، Ecad، DNMT1

## **Abstract**

**Aim:** Acute promyelocytic leukemia (APL) is one of the subtype of Acute Myeloid leukemia (AML) in which a fusion protein has a negative impact on differentiation of the myeloid progenitor cells and their maturation would stay at promyelocytic stage. DNA methylation is an epigenetic mechanism that often modifies the function of genes and affect gene expression, which may sometimes lead to cancer development. Many studies have found that DNA methylation could predict clinical outcome in AML patients and abberant DNA methylation can serves as a biomarker for risk stratification. The key role of DNMT1 in pathogenesis of various cancers and control of methylation motivated us to have study in this field. Ecad gene is also a tumor suppresor gene and play a pivotal role in controlling the proliferation of mammalian cells. One of the factors controlling its expression is promoter methylation by DNMT1 enzymes. Consequently, investigatong the correlation between DNMT1 promoter methylation and Ecad gene expression would be of significance in producing new drugs for treating APL disease.

**Methods:** The DNA of white blood cells of 15 patients and 5 healthy control subjects were extracted, treated with bisulfite, and DNMT1 gene promoter methylation was subsequently analyzed using the MSP technique. We used Real-time PCR to measure the expression level of Ecad gene to find out if there is any relation between pattern of DNMT1 gene promoter methylation and Ecad gene expression.

**Results:** After performing MSP, we found that the promoter methylation pattern of DNMT1 was unmethylated. Unmethylation of DNMT1 gene promoter was detected in 100% of samples. Ecad expression was upregulated 3.1 fold compared to control group.

**Conclusion and discussion:** As DNMT1 gene promoter was unmethylated and it was upregulated in comparison to controls, using epigenetic mechanisms for reducing it's expression would be of help; however, MSP may not disclose subtle changes in methylation level. Analyzing Ecad expression, we found that there is not obvious correlation between methylation pattern of DNMT1 gene and Ecad expression in patients with APL.

**Key words:** Acute promyelocytic leukemia, promoter methylation, Ecad, DNMT1



**Qazvin University of Medical Sciences**

**Faculty of Paramedical Sciences**

Thesis submitted for the degree of MSc in Medical Biotechnology

**Title:**

**Investigation the correlation between methylation patterns of DNMT1 gene promoter with Ecad gene expression in patients with Acute Myeloid Leukemia (M3)**

**Supervisors:**

**Dr. Sahmani**

**Dr. Azad**

**Advisor:**

**Dr. Foroughi**

**By:**

**Sanaz Zebardast**

**Summer 2018**